

生物相容性聚轮烷合成、自组装和对两性霉素 B 的溶血性能降低作用研究

张晓雯, 冯增国

北京理工大学材料科学与工程学院, 北京 100081

摘要 利用经典原子转移自由基聚合法 (ATRP) 合成了一系列以 Pluronic F127- β -环糊精 (β -CD) 包合物为中心, 聚端甲基多缩乙二醇甲基丙烯酸酯 (PPEGMA) 为大的封端基团的主链型三嵌段聚轮烷。实验过程中, 利用 2-溴异丙酰化的 Pluronic F127- β -CDs 自组装所得到的聚准轮烷为大分子引发剂, 用 CuCl/PMDETA 作为催化剂, 在水相体系中, 室温 (25℃) 下引发大分子单体端甲基多缩乙二醇甲基丙烯酸酯 (PEGMA) 在准轮烷两端进行聚合, 成功合成了具有管道结晶疏水的中间链段和亲水聚合物端基的聚轮烷。文中分别用 $^1\text{H-NMR}$, GPC 和 DSC 对合成的聚轮烷的性质进行了表征。由于其特殊亲疏水的嵌段结构, 本文中制备的聚轮烷能够在水中自组装形成聚集体, 以 F-30 β -CD-60 样品为例, 对其自组装性能以及对两性霉素 B (AmB) 的溶血性能降低作用进行了研究。结果表明, 经 F-30 β -CD-60 自组装体对 AmB 有很高的药物包覆量 (8.7%) 及药物包覆率 (87%), 且经包覆的 AmB 溶血性能明显降低, 表明自组装体能够有效降低 AmB 的溶血毒性。其临界聚集浓度 (CAC) 利用荧光探针法进行了测定, 同时用透射电镜 (TEM) 对聚集体的形貌进行了观察。

关键词 聚轮烷; 自组装; 两性霉素 B

中图分类号 R318.08

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)21-0024-08

Preparation and Self-assembly of Biocompatible Polyrotaxane and Hemolysis Evaluation of Amphotericin B After Being Loaded by the Self-assembly

ZHANG Xiaowen, FENG Zengguo

School of Materials Science and Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

Abstract A kind of novel amphiphilic triblock copolymers containing polyrotaxane (PR) as a central block was synthesized via the ATRP of poly (ethylene glycol) methyl ether methacrylate (PEGMA) initiated with polypseudorotaxanes made from a distal 2-bromopropionyl end-capped Pluronic F127 with a varying amount of β -CDs in the presence of CuCl/N,N,N',N'',N''-pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA) at 25℃ in an aqueous

medium. The structure of the resulting copolymers was characterized in detail by $^1\text{H-NMR}$, GPC and DSC analyses. As a typical sample, F-30 β -CD-60 was found to be self-assembled into nano-sized aggregates in water. Its critical aggregation concentration was estimated by the fluorescence probe technique. The transmission electron microscopy images further revealed that the sizes of the polymeric micelles of this selected copolymer were in nano-scale and smaller than those of the blank brush-like block copolymer. These nano-sized particles showed a great potential to be used as carrier for the controlled release of Amphotericin B (AmB) with 8.7% drug-loading content and 87 % drug-loading efficiency. And it is also true that the hemolysis of AmB has been significantly decreased after being loaded by the self-assembly.

Keywords polyrotaxane; self-assembly; Amphotericin B

0 引言

环糊精 (CD) 是以 D-(+) 葡萄糖作为重复单元, 通过 α -1,4-糖苷键连接起来的环状低聚糖。CD 分子具有锥形的圆筒状结构, 空腔内侧疏水、外侧亲水, 且具有局部的手性空间。

收稿日期: 2009-07-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20374008)

作者简介: 张晓雯, 博士研究生, 研究方向为超分子聚合物的合成与应用研究, 电子信箱: wendy511@bit.edu.cn; 冯增国 (通信作者), 研究员, 研究方向为生物相容性高分子合成与性质研究, 电子信箱: sainfeng@bit.edu.cn

其空腔可以容纳多种有机和无机小分子,形成包结物(ICs)。20 世纪 90 年代以来,环糊精对大分子的选择性包结作用形成项链状超分子结构引起了国内外学者广泛的研究兴趣,Harada 于 1990 年首次制得了基于环糊精的聚轮烷^[1],由于其在刺激响应材料^[2-3]、超分子水凝胶^[4]、生物传感器^[5]和药物控制^[6]等领域的应用前景非常好,近几年被广泛关注。

自组装是设计功能性智能材料和生物纳米结构的关键^[7]。两亲性嵌段共聚物根据其特殊的化学结构或分子组成,可以形成胶束、囊泡和微球等各类形态的自组装体^[8-9],在理论研究和实际应用研究中都得到了广泛关注。由于这些吸引人的形态和特点,它们在热稳定性、体内长期循环性,以及对特殊部位或组织的靶向性等方面都表现出很大的优势,人们在嵌段共聚物自组装体用于药物载体方面已经进行了深入研究^[10]。

聚轮烷是通过将环状分子(主体分子)穿到大分子链上,通过主-客体相互作用形成项链状结构,并用大的基团或寡聚物进行封端后生成的一类超分子聚合物^[11-12]。由于环糊精在主链上的可滑动/转动性能,在过去 10 年中,聚轮烷在各种纳米尺寸分子装置领域中展现出巨大的应用潜力,基于环糊精的聚轮烷在构建多种自组装体如胶束^[13]、水凝胶^[14]、囊泡^[15]等方面得到了广泛的研究,但这些自组装体大部分都是通过对环糊精进行修饰或接支实现的^[16]。不同于传统的聚轮烷多以结晶沉淀或物理交联水凝形式出现^[17-18],本研究合成了一系列以 Pluronic F127- β -CD 包合物为结晶疏水中间链段,亲水刷子装聚端甲基多缩乙二醇甲基丙烯酸酯(PPEGMA)为封端基团的聚轮烷,并在此基础上研究了其自组装性能以及对两性霉素 B(Amphotericin B, AmB)的药物包覆性能。众所周知,纳米尺寸微粒已被广泛的应用于药物负载以改善靶向给药和控制释放。另外由于端甲基多缩乙二醇甲基丙烯酸酯(PEGMA)寡聚物能够在自组装体壳层形成一层致密的亲水保护层,降低组装体的表面缺陷并能阻止细胞贴覆,能够有效地延长药物体内循环时间,提高药效^[19]。

AmB 是一种多烯抗生素,现为治疗全身真菌感染的首选药物,也是内脏、黏膜和皮肤的利什曼病的重要辅助治疗药。但是 AmB 是一种毒性大、非水溶性的化合物,商品化的 AmB 包括:去氧胆酸钠-AmB 胶束分散体系(Fungizone)或其他脂质体结构,脂质体分散体系(Ambisome)、胶体分散体系(Amphotec)和脂质复合体(Abelcet)。虽然这些复合体能够有效降低 AmB 的副作用,但是把 AmB 用聚合物聚集体包覆增长其体内循环周期被认为是增强 AmB 治疗效果的有效途径,并能够降低 AmB 的剂量、毒性和费用^[20-22]。本文以 AmB 为模型药物,经过聚轮烷聚集体包覆后,对其自组装性能也进行了一系列研究,同时通过计算自组装对 AmB 药物包覆量(Drug-loading Content, DLC)和药物包覆率(Drug-loading Efficiency, DLE)变化,总结了聚集体胶束对于 AmB 溶血活性的影响,AmB 溶血活性明显降低进一步证实了聚集体能够有效控制 AmB 的释放。

1 实验与测试

1.1 材料来源

β -CD 由天津韦斯公司提供,经 3 次重结晶后 80℃真空干燥后待用。Pluronic F127, PEGMA($M_n=1100$ g/mol), N,N,N',N'-五甲基二乙基三胺(PMDETA)和 N-苯基-1 萘氨(PNA)购自美国 Sigma 公司, PEGMA 聚合前先溶于四氢呋喃中经中性氧化铝柱除去阻聚剂。Pluronic F127 是一种 PEO 与 PPO 形成的三嵌段多聚醚,相对分子量约为 12 600, PEO 含量 70%,因此, Pluronic F127 的结构式通常认为是 $EO_{100}-PO_{65}-EO_{100}$ 。2-溴丙酰溴和 4-二甲氨基吡啶(DMAP)购自美国 Alfa Aesar 公司; AmB 购自 Amerasco 公司,三乙胺(TEA)和十二烷基磺酸钠(SDS)购自天津韦斯化学试剂公司,三乙胺在使用之前先用进行回流重蒸加入 CaH_2 储存;氯化亚铜($CuCl$)由氯化铜制得。N,N-二甲基甲酰胺(DMF)使用前用 CaH_2 除水减压蒸馏后用于作 GPC 流动相。其他试剂均为化学纯。

1.2 实验部分

1.2.1 合成大分子引发剂 2-溴丙酰溴端基 Pluronic F127 (BrP-F127-PBr)

将 Pluronic F127 酯化成相应的大分子引发剂方法如下:在三口烧瓶中加入 12.6 g (1 mmol) Pluronic F127 和 20 mL 干燥的 CH_2Cl_2 , 然后加入 0.42 mL (3 mmol) 三乙胺和 0.122 g (1 mmol) DMAP。在冰浴下搅拌并通过恒压滴液漏斗缓慢滴加溶有 0.86 g (4 mmol) 2-溴代丙酰溴的 15 mL CH_2Cl_2 溶液。冰浴条件下反应 1 h 后,置于室温下再反应 24 h。反应结束后,将溶液浓缩后过滤除去铵盐,并用无水乙醚沉淀,过滤后真空干燥。得到的粗产物用 20 mL CH_2Cl_2 溶解后重复上述纯化过程,经真空干燥,产物得率为 85%。经 1H -NMR 计算,酯化率 >98%。 1H -NMR ($DMSO-d_6$): δ 4.23~4.24 (d, 4H, $-CH_2-O-C(=O)-$), 1.02~1.04 (d, 210H, $-O-C(CH_3)_2-C-O-$), 1.89 (s, 6H, $(CH_3)_2-C-Br$) ppm。

1.2.2 原子转移自由基聚合法合成 PPEGMA-b-F127-b-PPEGMA 三嵌段共聚物

以 BrP-F127-PBr 为大分子引发剂, $CuCl$ /PMDETA 为催化剂,室温下水相中合成 PPEGMA-b-F127-b-PPEGMA 方法如下:在一个安培瓶中,用 2 mL 蒸馏水溶解 BrP-F127-PBr (0.13 g, 0.01 mmol), 然后加入 PEGMA (0.66 g, 0.6 mmol) 的 2 mL 水溶液,在加入 PMDETA (4.20 mg, 0.024 mmol) 后,整个体系置于液氮中进行催冷,再加入 $CuCl$ (2.0 mg, 0.02 mmol), 之后抽真空冲氮气 3 次后真空下封管,反应在 25℃水浴中搅拌反应 6 h, 打碎反应器终止反应。产物装入透析袋(MWCO 3500)中透析 48 h, 每 12 h 换 1 次水,整个产物进行冷冻干燥,粗产品溶于 10 mL DMF 后用无水乙醚进行分级沉淀。纯化后的产物经真空干燥后得率为 8.7%。

1.2.3 ATRP 法合成聚轮烷

PEGMA 的 ATRP 法合成聚轮烷的典型方法如下:在一个安培瓶中,一定量的 β -CD 水溶液加入 1 mL BrP-F127-PBr

(0.13 g, 0.01 mmol) 水溶液中, 剧烈搅拌 24 h 以便使制备聚准轮烷的过程达到平衡, 然后将 1 mL PEGMA (0.66 g, 0.6 mmol) 溶液加入到所制得的聚准轮烷中。用液氮冷冻后加入 CuCl (2.0 mg, 0.02 mmol), 之后抽真空冲氮气 3 次后真空下封管, 反应在 25℃ 水浴中搅拌反应 6 h, 打碎反应器终止反应。产物装入透析袋 (MWCO 3500) 透析 48 h, 每 12 h 换 1 次水, 在此期间将产物置于 60℃ 水中水煮透析 15 h, 整个产物进行冷冻干燥, 粗产品溶于 10 mL DMF 后用无水乙醚进行分级沉淀。纯化后的产物经真空干燥后得率为 41.6%。

为方便表达, ATRP 法聚合得到的聚轮烷用 F- $n\beta$ -CD- m 命名。其中, F 为 Pluronic F127, n 为 β -CDs 相对于 Pluronic F127 的摩尔投料比, m 为 PEGMA 相对于 Pluronic F127 的摩尔投料比。

1.2.4 制备 AmB 的聚轮烷胶束体系

这里, 用透析法制备纳米尺寸的 AmB 负载聚轮烷自组装体。具体方法是: 将 25 mg F-30 β -CD-60 聚轮烷样品和 2.5 mg AmB 同时溶于 1.0 mL DMF, 室温下搅拌 1.5 h 后装入透析袋 (MWCO 3500), 用 1 L 去离子水透析 24 h, 所得溶液用 0.45 μ m Whatman 过滤后测试该自组装体的药物包覆量 (DLC, %) 和药物包覆率 (DLE, %)。计算公式为

$$DLC = \frac{\text{自组装球体中 AmB 质量}}{\text{自组装球体质量}} \times 100\%$$

$$DLE = \frac{\text{自组装球体的 AmB 质量}}{\text{AmB 总质量}} \times 100\%$$

1.2.5 AmB 的体外溶血实验

取健康家兔原血 20 mL, 收集于含 5 mL 3.8 wt% 枸橼酸钠的 50 mL 器皿中, 全血 3 000 r/min 离心, 除去上清液, 再用等渗生理盐水冲洗 3~5 次, 每次加生理盐水 15 mL, 混匀后离心弃上清液, 直至上清液不呈红色为止。然后按所得红细胞液的体积用等渗生理盐水配制成体积百分比为 2% 的红细胞悬液 (RBC)。

将 2 mL 的 RBC 和 3 mL 上述制备的含有约 3 μ g/mL AmB 的聚轮烷的自组装体等渗生理盐水液混合, 制备多个样品。置于 37℃ 温箱中孵育, 每隔一定时间, 取出一个样品, 用 0℃ 冰浴终止溶血, 肉眼观察溶血情况, 离心 2 min, 除去未溶的 RBC, 收集上清液, 用 UV-Vis 分光光度计在 576 nm 处测定血红蛋白的吸光度。同时分别将 2 mL RBC 分别加入 3 mL 等渗生理盐水液及 3 mL 蒸馏水中, 以制备空白样品 (阴性对照组) 以及全溶血样品 (阳性对照组)。

RBC 的溶血率计算公式为

$$\text{溶血率} = \frac{ABS_n - ABS_0}{ABS_{100} - ABS_0} \times 100\%$$

式中, ABS_n 为样品的吸光度, ABS_{100} 为阳性对照组红细胞液样品吸光度, ABS_0 为阴性对照组红细胞液样品的吸光度。

1.3 测试手段

核磁共振氢谱 ($^1\text{H-NMR}$) 采用 Bruker ARX 400 核磁仪测定, 以 DMSO- d_6 作溶剂, 四甲基硅烷 (TMS) 为内标; 聚合物分

子量及分散度在 Waters 2410 型凝胶渗透色谱仪上测定, DMF+SDS 为流动相, 柱温 30℃, 流速 1.0 mL/min, 以单分散性的聚苯乙烯标样作普适校正。

DSC 使用 NETZSCH DSC 204 型差热分析仪, 扫描范围为 -30~120℃, 升温速率为 10 °C/min, 氮气氛围保护。数据获取方法如下: 先从室温加热至 120℃, 在 120℃ 下保持 5 min, 然后以 10 °C/min 的速度降温至 -30℃, 最后将样品以 10 °C/min 的速度升温至 120℃, 在第二次加热过程中获取数据。吸热峰所在温度即被认为是聚合物的熔融温度。

荧光采用 Varian Cary Eclipse 型荧光光谱仪测定, 用 PNA 作为荧光探针, 发射光谱波长测定范围 350~600 nm, PNA 的激发波长 340 nm。透射电镜 (TEM) 通过 JEM-2010 型透射电镜进行观察, 样品制备: 取 1 滴 0.5 mg/mL 的轮烷水溶液滴到铺有碳膜的铜网上, 真空干燥 12 h 后进行观察。

2 结果与讨论

2.1 大分子单体 PEGMA 的原子转移自由基聚合合成聚轮烷

以 BrP-F127-PBr 与 β -CDs 包结形成的聚准轮烷为引发剂, 利用 PEGMA 的原子转移自由基聚合合成两亲性聚轮烷的路线图如图 1 所示。理论投料量以及实际产物组成和得率情况见表 1。为了改善水相 ATRP 反应制备聚轮烷的可控性, 根据以前文献中的卤素交换原则, 用 CuCl 代替了 CuBr 作为催化剂, 同时, 将丁酰溴端基的引发剂换成丙酰溴端基的引发剂, 这是由于相对于丁酰溴的引发体系, 丙酰溴端基活性较小, 在改变水相体系 ATRP 反应可控性方面具有良好的作用^[23-24]。同时, BrP-F127-PBr 与 CuCl 和 PMDETA 的投料摩尔比例控制在 1:2:2.4。显然, 这些措施有效地改善了 ATRP 反应的可控性, 提高了产物得率。

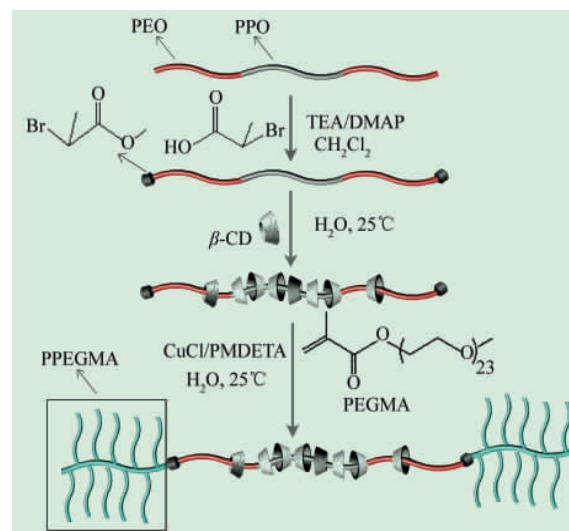


图 1 水相体系中用 PEGMA 的原子转移自由基聚合合成聚轮烷

Fig. 1 Synthetic pathway of PR-based triblock copolymers via ATRP of PEGMA in aqueous medium

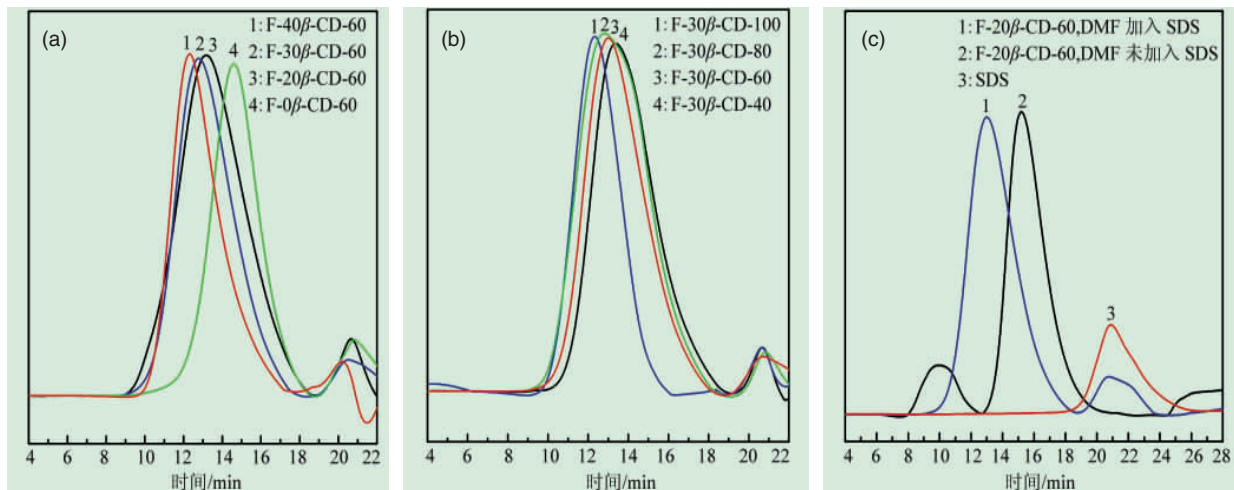


图3 聚轮烷 GPC 测试结果, (a)为 F-40 β -CD-60, F-30 β -CD-60, F-20 β -CD-60, F-0 β -CD-60 的 GPC 曲线, 以 DMF+1 wt% SDS 为流动相; (b)为 F-30 β -CD-100, F-30 β -CD-80, F-30 β -CD-60, F-30 β -CD-40, F-0 β -CD-60 的 GPC 曲线, 以 DMF+1 wt% SDS 为流动相; (c)为 F-20 β -CD-60 分别以纯 DMF 及 DMF+1 wt% SDS 为流动相的 SDS GPC 曲线, 纯 SDS 的 GPC 曲线

Fig. 3 GPC traces of F-40 β -CD-60, F-30 β -CD-60, F-20 β -CD-60 and F-0 β -CD-60 in (a), and F-30 β -CD-100, F-30 β -CD-80, F-30 β -CD-60 and F-30 β -CD-40 in (b) with DMF+1 wt% SDS as eluent, GPC traces of F-20 β -CD-60 and pure SDS in (c) with pure DMF or DMF+1 wt% SDS as eluent

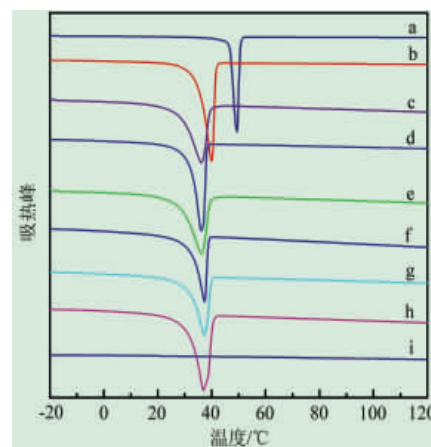
GPC 曲线表现出具有分子量明显不同的 2 个峰, 而且在 9 min 左右出现的单峰的分散度只有 1.05, 这说明可能是由于聚轮烷在纯的 DMF 流动相中产生聚集造成的, 而在 22 min 处没有出峰, 表明后处理产物中没有小分子物质 (如 β -CD、PEGMA 单体) 存在^[27]。然而, 在 DMF 中加入 SDS 后, 分子量较大的峰消失了, 但在约 22 min 有另外一个峰出现, 这是 SDS 的流出峰, 这一点可以从未加入样品的空白样 (流动相) 的流出曲线中得以证实。因此可以断定, 在流动相中加入 SDS 能够有效破坏聚轮烷在 DMF 中的聚集。相对于未加入 SDS 的 F-20 β -CD-60 样品的 GPC 曲线, 聚轮烷出峰时间也缩短了。这是因为加入 SDS 能够有效的破坏聚轮烷在 DMF 中的聚集, 同时导致分子链处于更加伸展的结构, 动力学体积也相应变大, 因此流出时间缩短。

如图 3, 所得到的聚轮烷分子量随着 PEGMA 和 β -CDs 摩尔投料量的增加会变大, 这进一步说明了 β -CD 的上链量以及 PEGMA 的聚合度可以通过改变它们与大分子引发剂的摩尔投料量进行调整。同时, 所有的聚轮烷样品的 GPC 图均为单峰且基本对称分布, 表明聚轮烷分子量分布均比较单一, 分散度也较窄为 1.49~1.63。说明该条件下制备聚轮烷反应体系也具有良好的可控性。

然而, 由 GPC 测试所得的聚轮烷分子量要明显高于 $^1\text{H-NMR}$ 分析计算所得分子量, 这应该与 GPC 测试本身的系统误差有很大关系, 因为 DMF 也只是聚苯乙烯的边缘溶剂, 聚苯乙烯作标准物并不非常适合于甲基丙烯酸类聚合物^[28]。同时, Pluronic F127 在与 β -CDs 形成包合物后分子链相对于自由的 Pluronic F127 或聚苯乙烯链处于更加伸展的状态, 因

此其动力学体积增大, 导致分子随流动相流出时间缩短, 分子量值变大。

本文中制备的聚轮烷和大分子引发剂、三嵌段共聚物 F-0 β -CD-60、聚准轮烷 F-30 β -CD 的 DSC 曲线如图 4 所示。对于大分子引发剂 BrP-F127-PBr, 在 49 $^{\circ}\text{C}$ 出现的吸热峰对应结晶 PEO 链段的熔融吸热峰; 而对于嵌段共聚物 F-0 β -CD-60, 其熔融吸热峰出现在 41 $^{\circ}\text{C}$ 低于 BrP-F127-PBr, 这是由于 Pluronic F127 链段的 PEO 与 PPEGMA 寡聚物的 PEO 链段相



a—BrP-F127-PBr; b—F-0 β -CD-60; c—F-30 β -CD-40;
d—F-20 β -CD-60; e—F-30 β -CD-60;
f—F-40 β -CD-60; g—F-30 β -CD-80;
h—F-30 β -CD-100; i—F-30 β -CD PPR

图4 聚轮烷的 DSC 曲线

Fig. 4 DSC curves of the obtained triblock copolymer

互作用的结果。根据过去的研究, β -CD 能够没有明显选择性地分散在 Pluronic F127 链段上,于是会破坏 PEO 链段的正常结晶,从而导致 PEO 熔融吸热峰消失如图 4 中的曲线 g。然而,本文中合成的聚轮烷在 36℃左右出现熔融吸热峰,这是由于聚轮烷两端的 PPEGMA 寡聚物中的 PEO 链段具有良好的结晶性,在加热过程中会有明显的熔融过程。进一步证明了 ATRP 法能够有效合成具有 PPEGMA 寡聚物为封端基团的聚轮烷,提供了合成及功能化聚轮烷的新思路和方法。

2.4 聚轮烷在水中自组装行为的初步研究

下面以 F-30 β -CD-60 聚轮烷样品为例,说明由结晶疏水中间段与亲水刷状 PPEGMA 共同构成的两亲性聚轮烷的自组装行为。为方便比较,对 F-0 β -CD-60 的自组装行为进行了研究,各项性能指数见表 2。

在水中发现,浓度为 0.5 mg/mL 的聚轮烷水溶液会折射出淡蓝色的光,说明了自组装行为的发生。根据文献报道,这里以 PNA 作为荧光探针,用荧光发射光谱证实该现象^[20,29]。

表 2 聚轮烷样品水中自组装性能以及对 AmB 药物包覆研究
Table 2 Self-aggregate and drug delivery properties of F-30 β -CD-60 and F-0 β -CD-60

编号	样品名	摩尔组成		CAC ^b /(mg·mL ⁻¹)	DLC ^c /%	DLE ^d /%
		投料比	产物组分 ^a			
1	F-0 β -CD-60	1:60	1:77.8	0.0803	4.6±0.2	46±2.0
2	F-30 β -CD-60	1:30:60	1:20.0:70.2	0.0089	8.7±0.3	87±2.5

注:a—¹H-NMR 测得,DMSO-d₆ 为溶剂;b—荧光探针方法测得;c—DLC 药物包覆量;d—DLE 药物包覆率。
Notes: a, determined by ¹H-NMR in DMSO-d₆; b, determined by fluorescence probe technology; c, drug-loading content; d, drug-loading efficiency.

以聚轮烷 F-30 β -CD-60 样品为例,说明用荧光探针法进行临界聚集浓度(CAC)测试办法。相对于极性环境,PNA 在非极性溶剂或疏水环境中有很好的荧光敏感性,PNA 作为分子探针被广泛的用于研究表面活性剂或两亲性嵌段共聚物的临界聚集浓度或临界胶束浓度(CMC)的测定^[31]。如图 5,是不同浓度 F-30 β -CD-60 聚轮烷样品的荧光发射光谱,可以看到,当聚合物浓度较低时,PNA 的荧光发射强度基本不变。随着聚合物浓度增加超过一临界值后,PNA 的荧光发射光谱会发生突变,并随着浓度增大而迅速变大。同时最大荧光发射

强度会产生明显蓝移。这样,CAC 值可以用图 6 中的两条拟合直线的交点确定。这里, I_0 代表 PNA 在纯水中的荧光发射强度。在聚轮烷浓度低于 8.9×10^{-3} mg/mL 时, I/I_0 值基本保持不变,当聚轮烷浓度超过 8.9×10^{-3} mg/mL 时, I/I_0 值发生明显变化。 I/I_0 值突变点说明 PNA 分子开始由水中进入聚轮烷聚集体形成的疏水微区,说明聚轮烷浓度超过 8.9×10^{-3} mg/mL 时,自组装行为的发生,这一临界点即被认为是 F-30 β -CD-60 样品的临界聚集浓度值,这一值明显低于 F-0 β -CD-60 样品的临界聚集浓度值,说明 β -CD 的加入能够有效增强样品

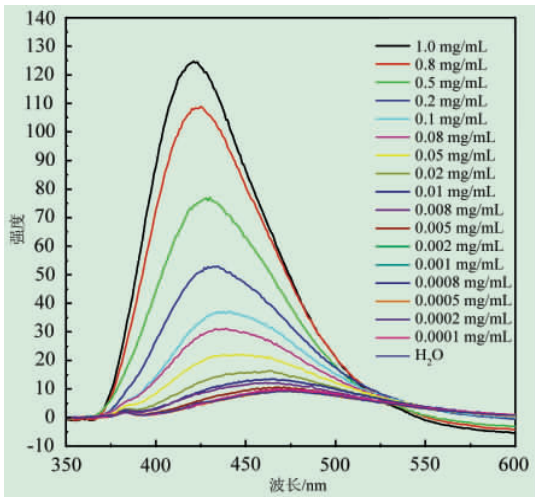


图 5 不同浓度(mg/mL)的 F-30 β -CD-60 条件下 PNA 的荧光发射光谱图([PNA]= 2.0×10^{-6} mol/L, λ_{exc} =340 nm)
Fig. 5 Fluorescence emission spectra of PNA at different concentrations of F-30 β -CD-60 in water ([PNA]= 2.0×10^{-6} mol/L, λ_{exc} =340 nm)

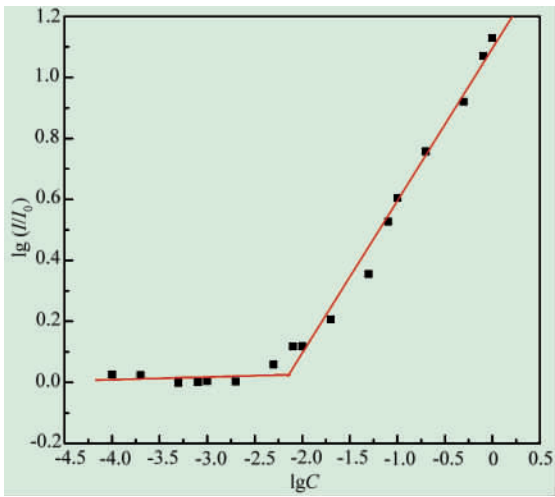


图 6 荧光发射强度比值 I/I_0 对不同浓度 F-30 β -CD-60 函数图(C (mg/mL))
Fig. 6 Plot of the intensity ratio I/I_0 as a function of the concentration of F-30 β -CD-60 (C (mg/mL))

的自聚集能力。

从前面的荧光探针结果可以看出,在 Pluronic F127- β -CD 包结物两端用低聚 PEGMA 封端不仅影响了分子链结构,同时也诱导了聚合物高分子在水中自组装行为的发生。这种行为进一步用透射电子显微镜(TEM)进行了观察。如图 7,插入的部分是自组装体的选区电子衍射图(SAED),表示无论 F-0 β -CD-60 图 7(a)和 F-30 β -CD-60 图 7(b)的自组装体都是无规聚集状态。电镜观察显示空白三嵌段共聚物 F-0 β -CD-60 的直径大约 100~150 nm,而 F-30 β -CD-60 样品的直径大约分别是 40~80 nm,远小于 F-0 β -CD-60 聚集体的尺寸。众所周知,聚合物自组装形成的纳米微粒(如胶束、囊泡)已被广泛的研究用于药物负载、增加疏水药物溶解度以及控制释放。况且, β -CDs 上有很多可以反应修饰的羟基,也为制备大分子潜体药物以及转基因治疗提供了很广阔的前景。因此,这里对以聚轮烷为基的聚合物的合成与自组装性能研究以及聚轮烷用于聚合物治疗方面提供了广阔的前景。

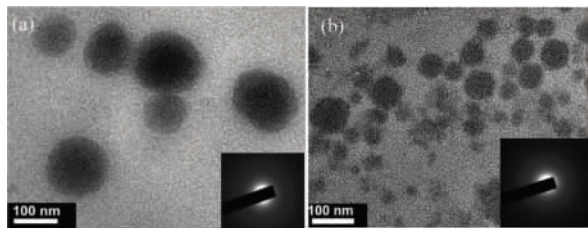


图 7 F-0 β -CD-60(a)和 F-30 β -CD-60(b)样品在水
中形成的自组装体的 TEM 图

Fig. 7 TEM images of the self-assemblies of F-0 β -
CD-60 (a) and F-30 β -CD-60 (b)

2.5 自组装体/AmB 纳米微球的溶血毒性评价

如图 8 所示,浓度为 3.0 μ g/mL 的纯 AmB 在 0.5 h 内对家兔红血细胞的溶血率已经超过 90%。相反,对于经相同浓度 AmB 负载的聚合物自组装体系而言,0.5 h 内几乎没有发现溶血现象,表明聚合物自组装体系对于 AmB 起到了良好的缓释效果。另外,对于未经 AmB 负载的聚合物自组装体系,经 12 h 仍未发现有溶血现象发生,说明聚合物本身对家兔红血细胞没有溶血作用。另外,聚轮烷为基的样品 F-30 β -CD-60 对于 AmB 的药物包覆能力及药物包覆率都明显高于 F-0 β -CD-60,说明 β -CD 的加入能够有效改善聚合物自组装体对于 AmB 的药物负载与控制释放效果。

3 结论

本文利用经典原子转移自由基聚合法合成了一系列以 Pluronic F127- β -环糊精包合物为中心,聚端甲基多缩乙二醇甲基丙烯酸酯为大的封端基团的主链型三嵌段聚轮烷。以 F-30 β -CD-60 样品为例,用透射电镜证实了其自组装性能。样品的临界聚集浓度用荧光探针手段进行测定。对其自组装性能和对 AmB 的溶血性能降低作用进行了研究。结果表明,经 F-30 β -CD-60 自组装体对 AmB 有很高的药物包覆量(8.7%)

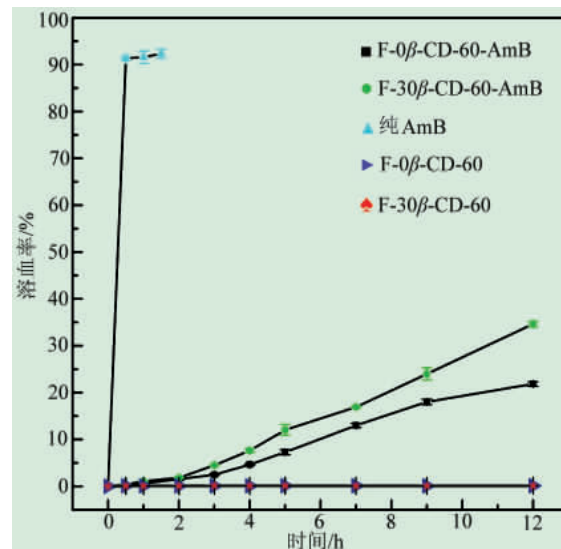


图 8 AmB 经聚合物自组装体系负载后的溶血率随时间变化
(AmB 浓度约为 3 μ g/mL)

Fig. 8 Hemolytic profiles of 3.0 μ g/mL AmB encapsulated
by PPs-based and blank triblock copolymer
aggregates as a function of time

和药物包覆率(87%),明显高于未加 β -CD 的空白三嵌段共聚物样品。且经 F-30 β -CD-60 自组装体包覆的 AmB 溶血性能明显降低,表明 F-30 β -CD-60 自组装体能够有效降低 AmB 的溶血毒性。

参考文献 (References)

- [1] Harada A, Kamachi M. Complex formation between poly (ethylene glycol) and α -cyclodextrin[J]. *Macromolecules*, 1990, 23(10): 2821-2823.
- [2] Huang J, Ren L X, Chen Y M. pH-/temperature-sensitive supramolecular micelles based on cyclodextrin polyrotaxane [J]. *Polym Int*, 2008, 57(5): 714-721.
- [3] Huh K M, Tomita H, Ooya T, *et al.* pH dependence of inclusion complexation between cationic poly (E-lysine) and α -cyclodextrin[J]. *Macromolecules*, 2002, 35(9): 3775-3777.
- [4] Yuan R X, Shuai X T. Supramolecular micellization and pH-Inducible gelation of a hydrophilic block copolymer by block-specific threading of α -cyclodextrin[J]. *J Polym Sci Part B*, 2008, 46(8): 782-790.
- [5] Ooya T, Eguchi M, Yui N. Supramolecular design for multivalent interaction: Maltose mobility along polyrotaxane enhanced binding with concanavalin A[J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(43): 13016-13017.
- [6] Harada A, Li J, Nakamitsu T. Preparation and characterization of polyrotaxanes containing many threaded α -cyclodextrins [J]. *J Org Chem*, 1993, 58(28): 7524-7528.
- [7] Zhang H, Ni P H, He J L, *et al.* Novel fluoroalkyl end-capped amphiphilic diblock copolymers with pH/temperature response and self-assembly behavior[J]. *Langmuir*, 2008, 24(9): 4647-4654.
- [8] Cheng Z P, Zhu X L, Kang E T, *et al.* Brush-type amphiphilic diblock copolymers from "Living"/controlled radical polymerizations and their aggregation behavior[J]. *Langmuir*, 2005, 21, 7180-7185.
- [9] Tang Y, Li C X. Preparation of novel amphiphilic copolymer microspheres and their drug-release and glucose-sensitive properties [J]. *Journal of*

- Applied Polymer Science*, 2008, 107, 3848–3852.
- [10] Forrest M L, Won C Y, Malick A W, *et al.* *In vitro* release of the mTOR inhibitor rapamycin from poly (ethylene glycol)-b-poly(ϵ -caprolactone) micelles[J]. *Journal of Controlled Release*, 2006, 110: 370–377.
- [11] Takata T, Kihara N, Furusho Y. Polyrotaxanes and polycatenanes: Recent advances in syntheses and applications of polymers comprising of interlocked structures adv[J]. *Polym Sci*, 2004: 171, 1–75.
- [12] Zhang X W, Zhu X Q, Feng Z G. Novel main-chain polyrotaxanes synthesized via ATRP of HPMA in aqueous media [J]. *J Polym Sci Part A*, 2008, 46: 5283–5294.
- [13] Auzely-Velty R, Djedaini-Pilard F, Desert S, *et al.* Micellization of hydrophobically modified cyclodextrins. 1. micellar structure [J]. *Langmuir*, 2000, 16(8): 3727–3734.
- [14] Manakker F, Pot M, Vermonden T, *et al.* Self-Assembling hydrogels based on β -cyclodextrin/cholesterol inclusion complexes [J]. *Macromolecules*, 2008, 41(5): 1766–1773.
- [15] Cristiano A, Lim C W, Rozkiewicz D I, *et al.* Solid-supported monolayers and bilayers of amphiphilic α -cyclodextrins[J]. *Langmuir*, 2007, 23(17): 8944–8949.
- [16] Ravoo B J, Darcy R. Cyclodextrin bilayer vesicles [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2000, 39(23): 4324–4326.
- [17] Li J, Li X, Zhou Z H, *et al.* Formation of supramolecular hydrogels induced by inclusion complexation between pluronics and α -cyclodextrin[J]. *Macromolecules*, 2001, 34(21): 7236–7237.
- [18] Kawasaki J, Satou D, Takagaki T, *et al.* Structural features of inclusion complexes of γ -cyclodextrin with various polymers [J]. *Polymer*, 2007, 48(4): 1127–1138.
- [19] Kwon G S, Kataoka K. Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles[J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 1995, 16 (2–3): 295–309.
- [20] Lee C T, Huang C P, Lee Y D. Preparation of amphiphilic poly (l-lactide)-graft-chondroitin sulfate copolymer self-aggregates and its aggregation behavior[J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7(4): 1179–1186.
- [21] Nagahama K, Mori Y, Ohya Y, *et al.* Biodegradable nanogel formation of polylactide-grafted dextran copolymer in dilute aqueous solution and enhancement of its stability by stereocomplexation[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(7): 2135–2141.
- [22] Zhou L M, Jiang X H, Hu X Q. Synthesis and properties of a novel class of gemini pyridinium surfactants [J]. *Langmuir*, 2007, 23 (23): 11404–11408.
- [23] Braunecker W A, Matyjaszewski K. Controlled/living radical polymerization: Features, developments and perspectives [J]. *Prog Polym Sci*, 2007, 32 (1): 93–146.
- [24] Matyjaszewski K, Shipp D, Wang J A, *et al.* Utilizing halide exchange to improve control of atom transfer radical polymerization [J]. *Macromolecules*, 1998, 31(20): 6836–6840.
- [25] Zhao T J, Beckham H W. Direct synthesis of cyclodextrin-rotaxanated poly (ethylene glycol)s and their self-diffusion behavior in dilute solution[J]. *Macromolecules*, 2003, 36(26): 9859–9865.
- [26] Fujita H, Ooya T, Yui N. Thermally induced localization of cyclodextrins in a polyrotaxane consisting of α -cyclodextrins and poly (ethylene glycol)-poly (propylene glycol) triblock copolymer [J]. *Macromolecules*, 1999, 32(8): 2534–2541.
- [27] Ikeda T, Watabe N, Ooya T, *et al.* Study on the solution properties of thermo-responsive polyrotaxanes with different numbers of cyclic molecules[J]. *Macromol Chem Phys*, 2001, 202(8): 1338–1344.
- [28] Weaver J V, Bannister I, Robinson K L, *et al.* Stimulus-responsive water-soluble polymers based on 2-hydroxyethyl methacrylate [J]. *Macromolecules*, 2004, 37(7): 2395–2403.
- [29] Zhou L M, Jiang X H, Hu X Q. Synthesis and properties of a novel class of gemini pyridinium surfactants [J]. *Langmuir*, 2007, 23 (23): 11404–11408.
- [30] Xu P S, Tang H D, Li S Y, *et al.* Enhanced stability of core-surface cross-linked micelles fabricated from amphiphilic brush copolymers[J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(5): 1736–1744. (责任编辑 王芷)

·学术动态·



“第 12 届中国机器学习会议”征文

“第 12 届中国机器学习会议”(CCML2010)将于 2010 年 8 月 6–8 日在济南市召开。此次会议由中国人工智能学会机器学习专业委员会和中国计算机学会人工智能与模式识别专业委员会联合主办,山东大学承办,河北大学协办。该系列会议每两年举行一次,已经成为国内机器学习界重要的学术活动之一。会议将邀请国内机器学习领域的著名学者做精彩报告,会议期间还将评选优秀论文奖和优秀学生论文奖。

此次会议的征稿范围(不限于)包括:机器学习的新理论、新技术与新应用,人类学习的计算模型,计算学习理论,监督学习,非监督学习,半监督学习,强化学习,多示例学习,神经网络,集成学习,多策略学习,特征选择,流形学习与降维,基于案例的推理,增量学习与在线学习,对复杂结构数据的学习,增强学习系统可理解性,数据挖掘与知识发现,聚类,生物特征识别,进化计算,人工生命,模糊集与粗糙集,多 Agent 系统中的学习,模式识别,信息检索,生物信息学,语音、图像处理与理解,自然语言理解等。

会议录用的论文将推荐给《计算机研究与发展》、《模式识别与人工智能》、《山东大学学报》(工学版)、《计算机工程与应用》、《广西师范大学学报》和《广西大学学报》等期刊的正刊上发表。征文截稿日期:2010 年 1 月 20 日。

会议论文采用在线投稿方式,网址:<http://ccml2010.sdu.edu.cn>。

电话:0531-88391367;电子信箱:ccml2010@sdu.edu.cn。